

兽医微生物学实验讲义

授课老师：刘广锦

liugj100@njau.edu.cn、

课前准备：

1. 兽医微生物学实验注意事项

实验时必须注意安全，防止人身和设备事故的发生；

穿实验服，不准在实验室内饮食；

未经允许不要接触仪器、培养物、试剂、动物等，不得将实验室物品带出实验室；

实验完毕，应清理实验场地，并将仪器、工具等放还原位；

实验后独立完成实验报告，不得抄袭或臆造。在下次上课前上交实验报告。

2. 实验报告格式

实验目的

实验原理

实验材料

实验步骤

注意事项

实验结果及分析

课后思考

实验一 显微镜的构造和使用及细菌形态结构的观察

一、主要内容

1. 普通光学显微镜的基本结构
2. 几种显微镜的简单原理
3. 光学显微镜的观察方式
4. 油镜的原理和使用
5. 使用完毕显微镜及标本片的处理
6. 玻片观察

二、作业

- 1、普通显微镜与油镜使用上有何区别？
- 2、绘出你所观察到的 3 种不同细菌形态（G⁺/G⁻）。

三、实验原理

什么是显微镜？

为什么要用显微镜观察？

人眼只能看到 0.2mm 以上的物体

细菌仅有 0.2-20 μ m，病毒更小，17-300nm，

光学显微镜结构

光学显微镜的分类

正置显微镜

倒置显微镜

体视显微镜

光学显微镜七种观察方式

四、实验步骤

油镜的使用

1. 识别：

油镜是一种放大倍数较高（95-100 倍）的物镜

一般刻有放大倍数（95×，100×）或标记：Oil

油镜的镜身最长，镜片最小

2. 原理：

油镜头与载玻片之间放上，与玻璃的折光指数相近的油类，如香柏油等，光线不会因折射而损失太大，可使视野分明，清楚进行观察。

3. 油镜的使用方法

A. 光圈调最大

B. 标本玻片上滴加香柏油 0.5-1 滴

C. 转换油镜头浸入油滴中,使其几乎与标本面接触为度

D. 双眼由目镜观察，慢慢转动粗准焦螺旋，使镜筒上提

E. 模糊看到有物像时，转动细准焦螺旋至物像清晰

4. 使用完毕显微镜及标本片的处理

油镜用过后，应立即用擦镜纸将镜头和玻片擦拭干净

如油渍已干，须用擦镜纸蘸少许二甲苯溶液拭去油渍，再用干擦镜纸拭净镜头

使用完毕显微镜，取下玻片，将物镜升到最高，光圈调最小，关闭电源，套上防尘罩，放回原处

实验二 细菌的抹片制备及染色

一、目的要求

1. 掌握细菌抹片的制备方法和无菌操作技术
2. 掌握几种常用的染色方法和技术
3. 巩固显微镜的使用，了解细菌的染色特性、形态

二、材料

- 1、大肠杆菌与金黄色葡萄球菌：液体
枯草芽孢杆菌：斜面（固体）

2、革兰染色液，生理盐水

3、载玻片、接种棒、酒精灯等

三、制片及染色步骤

取干净玻片-抹片-干燥-固定-染色-干燥镜检

1. 玻片的处理：

玻片应清晰透明、洁净而无油渍；

旧玻片有油，可用 95%酒精擦洗，然后在酒精灯上灼烧。

2. 细菌抹片的制备：

根据所用材料不同，抹片的方法也有差异。

(可用记号笔在玻片背面圈出涂抹区域)

(1) 固体培养物

用经酒精灯火焰烧过的接种环，蘸取生理盐水 1-2 环于清洁无油脂的载玻片中央，再经酒精灯火焰烧过的接种环勾取细菌的固体培养物少许混于生理盐水中，涂抹成直径为 1-1.5cm 大小圆，均匀的抹片。也可直接刮取菌落涂在玻片上

(2) 液体培养物

可直接用酒精灯火焰烧过的接种环勾取细菌培养物 1-2 环，涂抹于玻片上即可。但要注意将管底沉淀物摇匀，以免影响涂片效果。

涂抹后的接种环，酒精灯火焰烧过，充分灭菌。

(3) 组织涂片/触片

用灭菌的剪刀、镊子取被检组织一小块，以其断面在玻片上压触或涂抹成适当大小的薄片。如为脓汁、血液、乳汁等可直接涂抹于玻片上。

注意：无论何种方法切忌涂片太厚，宜轻不宜重，画同心圆，不要破坏细菌的正常排列，否则不利于染色和观察。

3. 干燥：

上述抹片应自然充分干燥

4. 固定

(1) 目的：

- 1)、除去抹片上的水分，使菌体蛋白附着在载玻片上，以防染色过程中被水冲掉。
- 2)、使抹片易于着色，变性的蛋白质着色力强。
- 3)、杀死抹片中的微生物。

(2) 方法：

1)、火焰固定：将已干燥的抹片菌膜面向上，以钟摆速度在酒精灯火焰上通过数次（以不烫手背为宜）。

2)、化学固定：用于组织触片，血液推片，加数滴甲醇于玻片上，固定 2-3 分钟后自然干燥。

四、常用的几种染色方法

1、革兰氏染色法

- 2、姬姆萨染色法
- 3、瑞氏染色法
- 4、美兰染色法

未经染色之细菌，由于其与周围环境折光率差别甚小，故在显微镜下极难观察，染色后细菌与环境形成鲜明对比，可以清楚地观察到细菌的形态、排列及某些结构特征，而用以分类鉴定。

1. 革兰氏染色法

是细菌学中广泛使用的一种鉴别染色法，这种染色法是由一位丹麦医生汉斯·克里斯蒂安·革兰（Hans Christian Gram, 1853年－1938年）于1884年发明。

1. 革兰氏染色法

1. 草酸铵结晶紫染色 2 min, 水洗
2. 革兰氏碘液媒染 2 min, 水洗
3. 95%酒精脱色约 30 s, 水洗
4. 沙黄水溶液复染 30 s, 水洗
5. 干燥, 镜检

3. 姬姆萨染色法

1. 甲醇固定 3 min, 时间长短均可
2. 姬姆萨液足量 30 min 或数小时至 24h, 水洗
3. 吸干镜检

4. 瑞氏染色法

1. 抹片干燥无需固定，直接滴加染色液 1-3 min,
2. 再加等量中性蒸馏水，轻轻混匀，续染 15 min,
3. 水洗，吸干镜检

注意事项

- 1、玻片要洁净无油，否则菌液涂不开
- 2、涂片不宜太厚，涂布时宜轻不宜重
- 3、保持无菌操作，EP管合盖前，管口消毒
- 4、接种环使用前后一定要在火焰上，烧红铂耳，由前向后，彻底灼烧灭菌，挑菌前待接种环冷却后才用

作业

1. 根据实验体会，你认为制备染色标本时应注意哪些事项？
2. 在你所做的革兰氏染色片中，大肠杆菌和链球菌各染成何色？它们是革兰阳性还是阴性菌？
3. 革兰氏染色的原理？

实验三 培养基的制备

刘广锦

一、 目的要求:

- 1、 掌握基础培养基制备的原则和要求;
- 2、 掌握一般培养基的制备过程及 pH 的测定

二 培养基的种类及用途

- 1、 固体培养基: 分离培养、纯培养、保存菌种;
(含 1.5-2%琼脂)
- 2、 半固体培养基: 细菌运动力的检查;
(含 0.2-0.5%琼脂)
- 3、 液体培养基: 观察细菌的生长状况、保存菌种。
(不含琼脂)

三、培养基制作的注意事项

- 1、 细菌生长所需的营养物质
- 2、 盛器不含抑菌物
- 3、 必须符合生长要求, 弱碱性 (pH7.2-7.6)
- 4、 要过滤, 应为半透明或透明
- 5、 制好后需高压灭菌, 后续试验必须保持无菌
- 6、 培养基中某些成分(血清、氨基酸、酶类等), 在高温下易分解、变性, 应无菌过滤 (0.22 μ m 滤膜) 后按规定温度加入培养基中

四、培养基制备的一般过程

按量称取→溶解→调 pH→分装→灭菌→菌检

LB 液体培养基制备 (Lysogeny broth)

1、按量称取:

蛋白胨 (Tryptone) 6 克
酵母提取物 (yeast extract) 3 克
NaCl 6 克

加去离子水 500ml, 充分溶解

2、调 pH:

用 1M NaOH 边加边搅拌, 不时用 pH 试纸测试;

当 pH 接近 7 时, 改用 0.1M NaOH, 直至 pH 值至 7.4~7.6

3、加去离子水定容至 600ml

4、分装:

每组 10 根试管, 3ml/管, 捆扎标记

5、灭菌 (121 °C, 20-30 分钟)

LB 固体培养基的制备

固体斜面:

测好 pH 后, 用量筒取 LB 液体培养基 500ml, 倒入锅中, 称量 10 克琼脂 (2%); 边加热边搅动 (勿溢出), 看一下水位, 补足水分; 待琼脂完全溶解后, 每组分装 10 根长管, 8ml/管; 捆扎标记, 剩余培养基装入广口瓶中, 灭菌 (121 °C, 20-30 分钟); 趁热将试管口一端搁在玻棒上, 倾斜放置, 冷却凝固。

LB 固体培养基的制备

LB 平板:

趁热取出高压灭菌好的固体培养基；在超净台中，倾倒平皿，15-20 ml/ 块，在桌面上轻轻回转平皿，使培养基平铺于皿底；每组 10 块无菌平皿；放置冷却，密封保存。

五、作业

- 1、制作培养基时应注意哪几点？
- 2、液体培养基与固体培养基各有什么用途？

准备：

葡萄糖蛋白胨水

葡萄糖 1 g

蛋白胨 1 g

K₂HPO₄ 0.4 g

水 200ml

pH 7.2-7.4

6ml/管，分装 30 管

用途： 用于 M.R 和 V.P.试验用

实验四 细菌的分离培养及移植

刘广锦

一、目的要求

- 1、掌握细菌分离培养的基本要领和常用方法
- 2、使被检材料适当稀释，以求获得独立单菌落
- 3、复习实验二的染色镜检

二、实验材料

菌种： 细菌斜面， 细菌肉汤

培养基： LB 平板、LB 斜面、LB 液体

接种环、酒精灯、玻片、革兰染色试剂， 光学显微镜

镜检

无菌操作， 挑取每个肉汤和斜面中的细菌

革兰染色：

1. 草酸铵结晶紫染色 2 min， 水洗
2. 革兰氏碘液媒染 2 min， 水洗
3. 95%酒精脱色约 30 s， 水洗
4. 沙黄水溶液复染 30 s， 水洗
5. 干燥
6. 镜检

三、细菌的分离培养方法

1、纯培养的获得与移植法

纯培养： 混合的细菌材料， 在平板上划线培养（平板划线分离培养法）， 获得单独的菌落， 再移植到其他培养基；

移植： 纯培养的细菌需要大量繁殖， 这个过程就是移植。

移植过程： 平板/斜面→肉汤

2、芽胞需氧分离培养法：

80℃水浴 15 - 20 分钟， 杀死不耐热的细菌繁殖体， 再接种至平板， 带芽孢的细菌可生长

3、化学药品分离培养法：

抑菌作用： 培养基中加入青霉素抑制 G+ 生长， 以分离 G- 细菌

杀菌作用： 病料经 15% 硫酸处理， 其他细菌皆被杀死， 结核菌因抗酸存活

鉴别作用： SS 培养基可鉴别大肠杆菌和沙门氏菌

4、实验动物分离培养法：

易感动物攻毒再分离培养

5、厌氧培养法

三、实验内容

1、平板划线法： 肉汤→ 1 平板/人， 标记， 接种完毕标明细菌、日期、班级、组名， 第二天下午抽时间看培养结果。

作业

- 1、何谓纯培养？ 分离纯培养的目的何在？
- 2、如何判断获得的是细菌纯培养物？
- 3、本次试验的细菌染色结果是什么？
- 4、为什么要把培养皿（平板）倒置培养？

实验五 细菌的药敏试验

刘广锦

药敏试验的方法

Kirby-Bauer Test (K-B 纸片扩散法):

细菌涂布平板

放置含某种药物的滤纸片

根据纸片周围有无抑菌圈及直径大小, 判断该菌对各种药物的敏感程度。

最低抑菌浓度试验 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

将抗菌药物倍比稀释, 在不同的稀释管内接种被检细菌, 以能抑制细菌生长的最高稀释度作为该抗菌药物的最低抑菌浓度。

最低抑菌浓度试验

优点: 结果较准确, 有阴阳性结果和质控菌株做参考

受影响因素:

培养基的 pH、渗透压及电介质

接种菌量

抗菌药物: 用标准粉剂, 不得使用口服药

药敏试验/Etest 法: 药敏试验/自动化仪器法

一、目的要求

掌握纸片法检测细菌对抗菌药物敏感性的操作方法

观察抑菌圈的大小, 了解抑菌的判定方法

二、实验材料

菌种: 大肠杆菌, 沙门氏菌

药敏纸片 (7 种): 青霉素、链霉素、庆大霉素、阿米卡星、红霉素、呋喃妥因、复方新诺明

培养基: LB 平板

接种环、酒精灯、镊子

三、操作步骤

四、结果观察

根据抑菌圈的大小判断细菌对药物的敏感程度: 敏感, 中介和不敏感 (耐药)

CLSI 每年发布新标准

质控: 标准菌株的试验结果应落在 CLSI 标准范围内, 如果超出该范围, 应视为失控而予以纠正。

五、作业

- 1、什么叫细菌对抗菌药物的敏感度, 了解它有何实际意义?
- 2、就你所做的药敏试验中, 何种抗菌药对所用细菌最敏感?
- 3、药敏片法操作时的注意事项?

实验六 细菌的生化试验

• 一、目的要求

- 1、了解细菌生化试验在细菌学诊断上的重要意义
- 2、掌握几种生化试验的方法

• 二、实验材料

- 细菌
- 微量发酵管
- 试剂等
- API 菌种鉴定系统
由法国生物-梅里埃公司生产的细菌数值分类分析鉴定系统。
可鉴定的细菌大于 800 种。

• 三、实验内容及操作

- 1、糖或醇发酵试验
- 2、枸橼酸盐利用实验
- 3、硫化氢实验
- 4、尿素实验
- 以上均在微量发酵管中进行反应

5、靛基质（吲哚）试验：

将细菌接种于蛋白胨水的试管中→置温箱中，37℃培养 24-48h→取出试管→加乙醚 1ml，振荡→沿壁加 4-5 滴对二甲氨基苯甲醛，观察结果。

6、甲基红（M-R）试验：

将细菌接种于葡萄糖蛋白胨水的试管中→置温箱中，37℃培养 24-48h→取出试管→加甲基红 4-5 滴，摇匀。

7、V-P 试验：

将细菌接种于葡萄糖蛋白胨水的试管中→置温箱中，37℃培养 24-48h→取出试管→加 V-P 甲液 0.6ml 摇匀→加 V-P 乙液 0.2ml，5min 之内看结果。

8、运动性试验

取直的接种针，火焰灭菌，沾取菌液，沿轴心穿刺接种于半固体培养基中，深入 3-4cm，37℃培养 24h 后观察结果。

- 糖发酵试验
- 原理

多糖 → 单糖 → 丙酮酸 → 酸性产物(或产酸产气) → pH↓ → 指示剂呈酸性变色
(若产气者有气泡出现)

培养基：微量发酵管

试剂：溴甲酚紫(pH7.0 紫色 - pH5.4 黄色)

结果:培养基是否有酸性变色(变黄)

应用：观察细菌对糖度的分解情况，常用于肠道杆菌的鉴定

糖发酵试验结果判断

糖发酵试验

枸橼酸盐利用试验

- 原理：

某些细菌能利用培养基中的枸橼酸盐作为唯一碳源，也能利用其中的铵盐作为唯一氮源，细菌生长过程中分解枸橼酸盐产生碳酸盐和分解铵盐生成的氨，使培养基变碱，是指示剂呈碱性反应。

培养基：枸橼酸盐微量生化管(草绿色)

试剂：溴麝香草酚蓝 (pH6.0 以下呈黄色, pH7.6 以上呈蓝色)

结果：培养基变蓝：+ 培养基不变色：-

应用：肠杆菌科属间鉴别

枸橼酸盐利用试验结果判定

 阴性(-) 阳性(+)

硫化氢试验

原理：细菌分解蛋白质中的含硫氨基酸，生成硫化氢，硫化氢与培养基中的铁盐或铅盐结合生成黑色的硫化铅或硫化亚铁。

培养基：含硫酸亚铁或醋酸铅的培养基

结果：培养基 变黑 + 为阳性，
 不变黑 - 为阴性

应用：常用于肠道杆菌的鉴定

硫化氢试验结果判定

 阴性(-) 阳性(+)

尿素酶试验

原理：产生脲酶的细菌，能水解尿素生成氨和 CO₂，氨使培养基呈碱性变色。

培养基：尿素培养基

试剂：酚红指示剂

结果：培养基变红：+
 培养基不变色：-

应用：肠杆菌科属间鉴定

尿素酶试验结果判定

 阳性(+) 阴性(-)

靛基质试验(吲哚试验)

原理：细菌若含有色氨酸酶，可分解蛋白胨中的色氨酸，生成靛基质（吲哚），靛基质与试剂对二甲基氨基苯甲醛作用，生成玫瑰靛基质。

培养基：含有细菌培养物的蛋白胨水 每人一管

试剂：靛基质试剂（含对二甲基氨基苯甲醛）

结果：加入试剂后静置，培养基出现红色液面：+
 培养基液面为黄色：-

应用：用于肠道杆菌的鉴定

靛基质试验

甲基红试验

原理：细菌分解糖，产生丙酮酸，进一步生成大量混合酸，使培养基 pH 维持在 4.4 以下，加入甲基红后，使甲基红呈现红色反应。此为甲基红试验阳性。

培养基：含有细菌培养物的葡萄糖蛋白胨水 每人一管

试剂：甲基红试剂(pH4.2 红色 - pH6.3 黄色)

结果：加入试剂后，培养基呈现红色：+
 培养基不变色：-

应用：是肠道杆菌常用的生化反应试验，主要用于区别大肠杆菌和产气肠杆菌

甲基红试验

V-P 试验

原理：若细菌含有丙酮酸脱羧酶，可以将细菌分解葡萄糖产生的丙酮酸脱羧，生成中性的乙酰甲基甲醇，后者在碱性环境下可被氧化生成二乙酰，二乙酰再与含有胍基的化合物反应，生成红色的化合物，即为 V-P 实验阳性，又称二乙酰试验。

培养基：含有细菌培养物的葡萄糖蛋白胨水 每人一管

结果：加入试剂后，培养基呈现红色： +

培养基不变色： -

应用：是肠道杆菌常用的生化反应试验，主要用于区别大肠杆菌和产气肠杆菌

结果判定与记录

1.微量发酵管反应

2.蛋白胨水培养的细菌

靛基质试验（吲哚试验）：取出试管（蛋白胨水）→乙醚 1ml，振荡，静置，待分层后→沿管壁加入对二甲氨基苯甲醛 2-3 滴，静置，在分界处出现红色玫瑰吲哚为阳性。

3.葡萄糖蛋白胨水培养的细菌

- （1）甲基红（MR）试验：取出试管→加入甲基红 3-5 滴，摇匀，培养基变红色为阳性，不变色为阴性
- （2）VP 试验：取出试管→VP 甲液 0.6ml，摇匀→再加 VP 乙液 0.2ml，摇匀，15min 后看结果，变红为阳性，不变为阴性，橙色为结果不可信，需重做。

四 作业

- 1、填写生化反应记录表
- 2、解说你所做的生化反应各种原理
- 3、以上生化反应试验哪几个是分解糖？哪几种是分解蛋白质？

实验七 PCR 反应

- 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

一、实验原理

PCR 过程是由变性--退火--延伸三个基本步骤多次重复进行完成的

①变性：模板 DNA 经加热至 95°C 左右一定时间后，使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离，成为单链，使它与引物结合，进行下一轮反应；

②复性(模板 DNA 与引物的退火)：模板 DNA 变性成单链后，温度降至 55°C 左右，根据碱基互补配对原则，引物与模板 DNA 单链结合；

③延伸：DNA 模板-引物结合物在 Taq 酶的作用下，以 dNTP 为原料，靶序列为模板，按碱基互补配对原则，合成一条新的与模板 DNA 链互补的 DNA 链。

二、实验材料

- PCR 仪
- 电泳仪
- 凝胶成像系统
- PCR 管
- 枪头
- 移液器
- 琼脂糖凝胶

三、引物要求：

- (1) 引物长度以 15-40 bp 为宜。
- (2) 碱基尽可能随机分布。
- (3) G+C 占 40-60%，上下游引物应基本一致。
- (4) 引物内部避免形成二级结构 (发夹结构)；
- (5) 引物间避免有互补序列 (二聚体)。
- (6) 引物 3' 端为关键碱基；5' 端无严格限制。

四、注意事项

- 正确使用移液器；
 - 加入微量试剂时，枪头应深入到管内液面以下；
 - 配置 PCR 反应体系、加入模板、上样等步骤中，每加完一次，都应更换枪头；
 - 向琼脂糖凝胶中上样时，枪头不宜插入过深，以免破坏样品孔；
 - 记好自己的加样顺序。
 - 思考题
1. 一次特异性很好的 PCR 后，所得产物的长度都是一样的吗？
 2. 引物设计时应该考虑哪些因素？
 3. PCR 实验操作时需要注意什么？

实验八 病毒的鸡胚培养

刘广锦 副教授

概况

1911年 Rous 和 Murphy 首先应用鸡胚培养研究肉瘤病毒(Rous 肉瘤)的繁殖。
1938年 Goodpasture 和 Burnet 等应用鸡胚繁殖病毒、Cox 应用卵黄囊培养立克次氏体。

- 鸡胚的结构与生理

接种途径

- 1. **尿囊腔接种** (9-13 日龄鸡胚)：该途径一般用于流感、新城鸡瘟病毒和腮腺炎的适应和传代。
- 2. **羊膜腔接种** (11-12 日龄鸡胚)：这途径主要用于临床材料（如患者的鼻洗液及咽漱液）分离病毒。
- 3. **卵黄囊接种** (6-7 日龄鸡胚)：该接种途径主要用于抗流感病毒药物实验。

一、目的要求

- 掌握鸡胚尿囊腔接种技术和收获病毒方法。
- 无菌操作。

二、实验材料

9-11 日龄白壳 SPF 鸡胚，新城疫病毒，照蛋器，打孔器，剪刀，蛋盘，无菌注射器和针头，消毒酒精，酒精灯，石蜡等。

三、实验步骤

尿囊液的收取

气室消毒→击破气室卵壳并弃去→无菌小镊撕去壳膜→再撕绒毛尿囊膜(不撕破羊膜)→用镊子轻轻按住胚胎，无菌吸管吸取尿囊液(清亮透明液体)置无菌青霉素瓶中→待检测。

写上学号 姓名 尿囊液收取时间

操作步骤

- ① 先观察鸡胚发育情况：照蛋，取血管丰满者
- ② 划出气室位置，
- ③ 离气室边缘下部 5mm 避开大血管作一记号，定为注射入口。
- ④ 消毒打孔：先用碘酊再用酒精消毒，由顶部从里向外擦拭，记号处和气室顶端各打一孔。
- ⑤ 吸取病料(ND 病毒)，由注射入口小孔刺入 3-5mm，注射 0.1-0.2ml 病毒，拔出针头，以棉花蘸取石蜡涂布注射孔，石蜡封闭两孔(先封下面，再封上面)
- ⑥ 蛋壳注明日期，学号以及病毒名称
- ⑦ 置 37℃ 温箱中孵育（相对湿度保持在 45%~60%），24h 内死亡或血管不清者(病料未增殖)弃去，以后每日照蛋两次，96h 不死者将其冻死。血管冻后会收缩。
- ⑧ 冷冻后收获尿囊液检查。

四、思考题

鸡胚接种病毒有几种途径，各适用于什么实验？

尿囊腔接种的注意事项？